

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591633

研究課題名(和文)成熟T細胞リンパ腫でのc-MybとABCG2/BCRPによる抗癌剤耐性機序の解明

研究課題名(英文)The role of c-Myb and ABCG2/BCRP in the drug resistance of mature T-cell lymphomas

研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：60319663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において研究代表者は、成熟T細胞リンパ腫での新規c-Myb標的遺伝子として薬物トランスポーターABCG2/BCRPを同定した。c-MybとABCG2/BCRPは、成熟T細胞リンパ腫において共発現することが確認された。さらにABCG2/BCRP特異的阻害剤であるKo143は、ドキソルビシンのATLL細胞株に対する抗腫瘍活性を優位に促進した。これらの結果より、c-Myb-ABCG2/BCRP経路は成熟T細胞リンパ腫の抗がん剤耐性機構において重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have shown that an AP-1 family member, FRA-2, is consistently expressed at high levels in Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and up-regulates the expression of CCR4 as well as that of several proto-oncogenes such as c-Myb, MDM2, and BCL6. Here, we identified an ABC transporter, ABCG2/BCRP, as a target gene of c-Myb in mature T-cell lymphomas including ATLL and cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs). We detected the transcripts and proteins of c-Myb and ABCG2/BCRP in ATLL cells. Furthermore, Ko143, a selective ABCG2/BCRP inhibitor, enhanced the antitumor activity of doxorubicin against ATLL cell lines. Taken together, our findings support the notion that the c-Myb-ABCG2/BCRP pathway plays a role in chemoresistance of mature T-cell lymphomas.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学 抗がん剤耐性 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL) 皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は、AP-1ファミリーメンバーの一つであるFra-2が成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)で構成的に発現し、CCR4の発現誘導を介して皮膚局在に関与すること、また、c-Myb、MDM2、SOX4などの原癌遺伝子群の発現誘導を介して細胞増殖にも関与することを明らかにした(Nakayama et al., Oncogene, 2008)。また、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)は、CCR4とc-Mybを高発現すること、さらに、AP-1が恒常的に活性化されていることが示されておりATLLと類似する点が多い。そこで申請者は、CTCLでのFra-2-c-Myb経路の発癌における役割についても検討を行い、Fra-2によって発現誘導されたc-Mybは、さらに新規標的遺伝子であるRAS活性化因子、RASGRP2の発現誘導を介してCTCLの細胞増殖に関与することを明らかにした(若手(B): 課題番号 21791103)。

ATLLやCTCLではc-Mybの主要な標的遺伝子であるc-MycとBcl-2の恒常的な発現は認められなかったため、c-Mybはこれらの成熟T細胞リンパ腫では固形癌とは異なる標的遺伝子を持つことが示唆された。そこで申請者は、マイクロアレイ解析を用いたATLL細胞におけるc-Myb標的遺伝子の探索を行い、成熟T細胞リンパ腫でのc-Mybの下流標的遺伝子のひとつとして薬物トランスポーターABCG2/BCRPを同定した。ABCG2/BCRPは、肺癌や乳癌など様々な固形癌で高レベル発現が認められ、同時にイリノテカン、メトトレキサート、ゲフィチニブなど、多様な抗癌剤を基質とすることから、癌細胞の多剤耐性に極めて重要な役割を果たす分子として注目されている。しかしながら、ABCG2/BCRPの成熟T細胞リンパ腫におけるその発現と役割、また、c-Mybの抗癌剤耐性に関わる役割、についてはまだ知られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)および皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)でのc-MybによるABCG2/Breast Cancer Resistance Protein(BCRP)発現誘導機構の解析、およびABCG2/BCRP機能と抗癌剤耐性との関係を解析することにより、c-Myb-ABCG2/BCRP経路による抗癌剤耐性機序を解明することにある。さらに、抗癌剤にABCG2/BCRP阻害剤を併用することにより、成熟T細胞リンパ腫の新たな治療法を確立すること、また、抗癌剤耐性を克服することも目的としている。

3. 研究の方法

(1) ATLL細胞におけるc-Myb標的遺伝子の同定

siRNAによりc-Myb発現を抑制したATLL細胞株のマイクロアレイ解析により、ATLL細胞におけるc-Myb標的遺伝子の探索を行う。

(2) ATLLおよびCTCL細胞におけるc-MybとABCG2/BCRPの発現解析

ATLLとCTCL細胞株および患者由来ATLL細胞を用いて、c-Myb mRNAとABCG2/BCRP mRNAの発現をRT-PCRにより解析する。

(3) ATLL患者皮膚組織標本におけるc-MybとABCG2/BCRPの発現解析

ATLL患者皮膚組織標本についてc-MybとABCG2/BCRPの免疫染色を行い、タンパクレベルでの発現を確認する。

(4) ATLL細胞株を用いたABCG2/BCRPのプロモーター解析

ABCG2/BCRPプロモーター領域の様々なレポーターコンストラクトを作製し、ATLLおよび細胞株を用いてルシフェラーゼ解析を行い、転写活性化に必須の要素を同定する。c-Myb結合部位の重要性が確認された際は、c-Myb発現プラスミドを作製し、ABCG2/BCRPプロモーター活性に与える影響についても検討する。

(5) ABCG2/BCRP阻害剤と抗癌剤併用によるATLL細胞株に対する抗腫瘍活性の解析

ABCG2/BCRP阻害剤を用いて、様々な抗癌剤の抗腫瘍活性に対する影響を検討する。

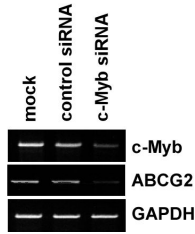
4. 研究成果

(1) ATLL細胞におけるc-Myb標的遺伝子の同定

ATLLおよびCTCL細胞株ではc-Mybの主要な標的遺伝子であるc-MycとBcl-2の恒常的な発現は認められなかったため、c-Mybはこれらの成熟T細胞リンパ腫では固形癌とは異なる標的遺伝子を持つことが示唆された。そこで申請者は、siRNAによりc-Myb発現を抑制したATLL細胞株のマイクロアレイ解析により、c-Myb発現抑制によりその発現が抑制されるc-Myb下流標的遺伝子として薬物トランスポーターABCG2/BCRPを同定した。

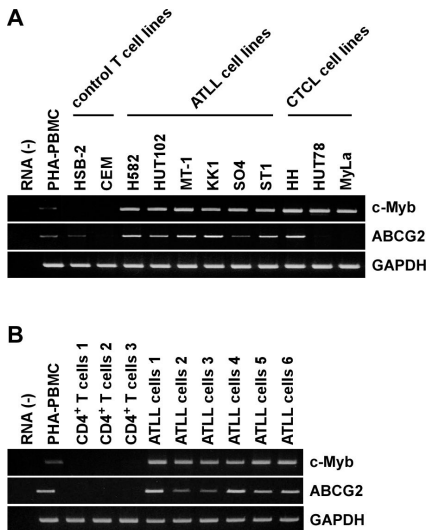
次にRT-PCR解析により、ATLL細胞株ST1細胞におけるABCG2/BCRP発現へのc-Myb siRNAの効果を検討した。図に示すように、c-Myb siRNAがST1細胞においてその対応するmRNA発現を特異的に抑制することが確認された。さらに、これらの条件下において、ABCG2/BCRP発現が有意に抑制されることが確認された。

ATLL細胞株ST1細胞



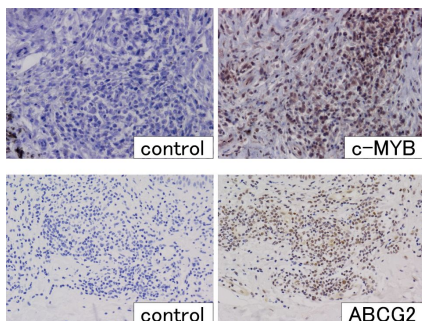
(2) ATLL および CTCL 細胞における c-Myb と ABCG2/BCRP の発現解析

ATLL および CTCL 細胞株では、c-Myb の発現が強く増強されていた。また、ATLL 細胞株では、c-Myb の下流標的遺伝子として同定された ABCG2/BCRP の恒常的な発現も認められた。一方で CTCL 細胞株では、HH 細胞においてのみ ABCG2/BCRP の発現が認められた (A)。さらに c-Myb と ABCG2/BCRP は、ともに正常 CD4 陽性細胞では発現せず、患者由来 ATLL 細胞において特異的に発現することが確認された。



(3) ATLL 患者皮膚組織標本における c-Myb と ABCG2/BCRP の発現解析

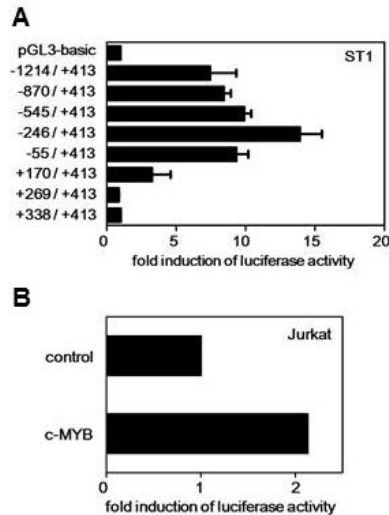
次に免疫組織染色により ATLL 患者の皮膚組織における c-Myb と ABCG2/BCRP のタンパクレベルでの発現を検討した。その結果、ATLL 患者皮膚組織の腫瘍細胞において、c-Myb と ABCG2/BCRP の強いシグナルが検出された。



(4) ATLL 細胞株を用いた ABCG2/BCRP のプロモーター解析

これまでの結果より、ABCG2/BCRP が c-Myb の下流標的遺伝子であることが示された。そこで次に ABCG2/BCRP プロモーターを用いて、ATLL 細胞株での c-Myb による ABCG2/BCRP 発現誘導機構を解析した。TFSEARCH program (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)を用い、ABCG2/BCRP プロモーター (-1214 ~ +413) に存在する転写因子結合部位の予測検索を行った。その結果、この領域には複数の c-Myb 結合部位が存在することが確認された。

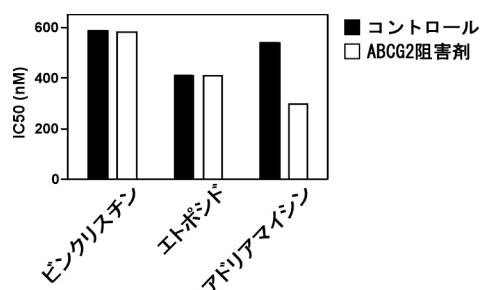
ATLL 細胞株での ABCG2/BCRP 発現に必要な領域を同定するため、ABCG2/BCRP プロモーターの欠失コンストラクトを作製し、ルシフェレースレポーター解析を行った。その結果、ATLL 細胞株において ABCG2/BCRP の発現には、プロモーターの -55 ~ +170 の領域が必須であることが明らかとなった (A)。実際に ABCG2/BCRP プロモーターの -55 ~ +170 の領域には 2 か所の c-Myb 結合領域が存在することが確認された。そこで次に Jurkat 細胞を用いた再構築系により、c-Myb の ABCG2/BCRP プロモーター活性化に与える影響を検討した。ABCG2/BCRP プロモーターは、c-Myb 発現により活性化されることが示された (B)。



(5) ABCG2/BCRP 阻害剤と抗がん剤併用による ATLL 細胞株に対する抗腫瘍活性の解析

ABCG2/BCRP は、肺癌や乳癌など様々な固形癌で発現し、これらの癌細胞の多剤耐性に関与すると考えられている。そこで ABCG2/BCRP の ATLL 細胞における抗がん剤耐性に関わる役割について検討を行った。ABCG2/BCRP 阻害剤 Ko143 を用いて、様々な抗がん剤の ATLL 細胞株に対する抗腫瘍活性への影響を検討した。ABCG2/BCRP 阻害剤 Ko143 は、ATLL の治療に用いられている抗癌剤のうちアドリアマイシンによる抗腫瘍活性を選択的に促進した。これらの結果は、ATLL において c-Myb

が ABCG2/BCRP の機能的発現を誘導することを示した初めての実験であり、c-Myb-ABCG2/BCRP 経路が成熟 T 細胞リンパ腫の抗がん剤耐性機構において重要な役割を果たすことを強く示唆するものである。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Higuchi T, Nakayama T, Arao T, Nishio K, Yoshie O. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood. 査読有、2013 May 2;121(18):3640-9.

Kee JY, Ito A, Hojo S, Hashimoto I, Igarashi Y, Tsukada K, Irimura T, Shibahara N, Nakayama T, Yoshie O, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating natural killer T cells in a murine model. Oncol Rep. 査読有、2013 Mar;29(3):975-82.

Nakayama T, Higuchi T, Oiso N, Kawada A, Yoshie O. Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas. Anticancer Res. 査読有、2012 Apr;32(4):1367-73.

Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O. In situ expression of the CCL20-CCR6 axis in lymphocyte-rich gastric cancer and its potential role in the formation of lymphoid stroma. Pathol Int. 査読有、2011 Nov;61(11):645-51.

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：60319663

(2)研究分担者

義江 修 (YOSHIE, Osamu)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10166910

樋口 智紀 (HIGUCHI, Tomonori)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00448771